

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大谷一弘	主査教授 大槻 勝紀 副査教授 吉田 龍太郎 副査教授 田窪 孝行 副査教授 岡田 仁克
主論文題名 形質細胞様樹状細胞のケモカインレセプターCCR7 依存的、恒常的リンパ節への移住 (CCR7-dependent trafficking of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state conditions)	
学位論文内容の要旨	
《目的》 形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)は、I型インターフェロンを恒常的に産生し、抗ウイルス免疫反応や免疫系恒常性の維持に関わる。これまでの報告では、血中の pDC は炎症巣の局所リンパ節に集積するとされているが、炎症を起こしていないリンパ節や脾臓にも一定程度の pDC が存在する。このことは、pDC が恒常的にリンパ組織に移住していることを示唆する。本研究では、非炎症状態の二次リンパ組織への pDC の恒常的な移住の分子機構について解析し、とくにリンパ球移住にもっとも重要とされるケモカインレセプターCCR7 の関与について検討した。 《方法》 フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析： 野生型の C57BL/6 マウスと C57BL/6 の遺伝的背景を持つ CCR7 欠損マウスの末梢血を、ACK 溶解バッファー(0.15 M 塩化アンモニウム、10 mM 炭酸カリウム、0.1 mM Na ₂ EDTA)で溶血させ、赤血球を除去したのち、残存細胞を FITC 標識 anti-CD3 mAb	

とAPC 標識 anti-mPDCA-1 mAb で染色した。CCL19-Fc キメラ蛋白質を添加し、その結合を PE 標識 goat anti-human IgG pAb を用いて検出した。免疫染色したサンプルは、フローサイトメーターにより解析した。CD3⁺細胞と mPDCA-1⁺細胞の CCL19-Fc の結合能を、野生型と CCR7 欠損 pDC で比較した。

ケモタキシス・アッセイ:

野生型 C57BL/6 マウスの脾細胞から精製した pDC (4.0×10^4 cells /well) をポアサイズ 5 μ m のフィルターの上室に加え、2 時間後に、下室に存在する各濃度のケモカイン溶液に遊走した細胞数を算出した。野生型と CCR7 欠損マウス由来の脾細胞を 17.5% Accudenz 液を用いて、pDC を濃縮し、ケモタキシス開始 2 時間後に、下室に遊走した細胞を回収して、免疫抗体法で pDC を標識したのち、フローサイトメトリー解析を行い、下室に遊走した pDC の細胞数を算出した。

流れの無い条件下での細胞接着実験:

レコンビナント rat ICAM-1-Fc あるいはレコンビナント human IgG₁ Fc でコーティングされた Multiwell ガラススライド (直径; 4 mm) に、野生型マウスの脾細胞から精製した pDC (2×10^5 個) を加えた。5 分間静置したのち、フォルボールエステル あるいは様々な濃度の CCL21 を加え、さらに 5 分間、37°C で培養した。非接着細胞を洗い流したのち、顕微鏡で一視野に接着した細胞をカウントし、3 視野の平均 \pm SD を比較した。また百日咳毒素処理した、野生型から精製した pDC (2×10^5 個) をもちいて、同様の実験を行った。

マウスリンパ組織の pDC の定量的解析:

野生型マウス、CCR7 欠損マウスと *plt/plt* マウス (リンパ節の高内皮細静脈で CCR7 のリガンドを欠損しているマウス) の脾臓とリンパ節の細胞を 17.5% Accudenz 液を用い、pDC を濃縮後、免疫抗体法を用いて pDC を標識し、フローサイトメーターにより pDC の細胞数を解析した。

《結 果》

1. 正常マウスの末梢血由来の pDC は CCL19-Fc キメラ蛋白質の結合性によって、機能的な CCR7 を発現していることがわかった。

2. 正常マウスの脾臓から精製した pDC は、CCR7 リガンドである CCL21 ケモカインに対してリンパ球と同様の遊走能を示したが、CCR7 欠損マウス由来 pDC は、CCL21 に対して遊走しなかった。

3. 正常マウス由来、脾臓 pDC の ICAM-1 への接着は CCL21 刺激により増強されたが、一方、百日咳毒素処理によりその接着は完全に阻害された。

4. フローサイトメリーの結果、リンパ節の pDC は、CCR7 欠損マウスと *plt/plt* マウスにおいて、野生型マウスの 1/6 程度に減少していたが、脾臓の pDC には変化が見られなかった。

《結 論》

pDC は高内皮細静脈の細胞の表面での遊走あるいは接着の段階で CCR7 からのシグナルを必要とし、生理的条件下における pDC の恒常的なリンパ節への移住に、CCR7 を介したシグナルが重要であることが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	大谷一弘
論文審査担当者			主査教授 大槻 勝紀	
			副査教授 吉田 龍太郎	
			副査教授 田窪 孝行	
			副査教授 岡田 仁克	
主論文題名				
形質細胞様樹状細胞のケモカインレセプターCCR7 依存的、恒常的リンパ節への移住 (CCR7-dependent trafficking of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state conditions)				
論文審査結果の要旨				
<p>申請者は、非炎症状態の二次リンパ組織への pDC の恒常的な移住の分子機構について解析し、とくにリンパ球移住にもっとも重要とされるケモカインレセプターCCR7 の関与について検討している。その結果、正常マウスの末梢血由来の pDC は CCL19-Fc キメラ蛋白質の結合性によって、機能的な CCR7 を発現していることが明らかになった。また、正常マウスの脾臓から精製した pDC は、CCR7 リガンドである CCL21 ケモカインに対してリンパ球と同様の遊走能を示し、その遊走能は、CCR7 依存的であった。さらに、正常マウス由来、脾臓 pDC の ICAM-1 への接着は CCL21 刺激により増強された。フローサイトメトリーの結果、リンパ節の pDC は、CCR7 欠損マウスと CCR7 リガンド欠損マウスにおいて、野生型マウスの 1/6 程度に減少していたが、脾臓の pDC には変化が見られなかった。</p> <p>以上のことから、pDC は高内皮細静脈(High Endothelial Venule: HEV)の細胞表面での遊走あるいは接着の段階で CCR7 からのシグナルを必要とし、HEV を越えての恒常的なリンパ節内への移住に CCR7 を必要とすることが示唆された。今後、pDC における CCR7 シグナリングの詳細や他の複数の共同する可能性のあるケモカインシグナリングについて、さらなる研究が期待される。</p>				

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

大阪医科大学雑誌 68(3): 21-27, 2009